



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 44 13 023 A 1**

(51) Int. Cl. 6:
A 61 K 35/72

DE 44 13 023 A 1

(21) Aktenzeichen: P 44 13 023.6
(22) Anmeldetag: 18. 4. 94
(23) Offenlegungstag: 19. 10. 95

(71) Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

(72) Erfinder:
Habermann, Paul, Dr., 65817 Eppstein, DE; Fadda, Mauro, 65934 Frankfurt, DE

(54) Verfahren zur Gewinnung eines Faktors mit insulinartiger Wirkung aus Hefeextrakt

(57) Es wird ein Verfahren zur Gewinnung eines Faktors mit insulinartiger Wirkung aus Hefeextrakt beschrieben. Der Faktor eignet sich zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes mellitus oder nicht-insulinabhängiger Diabetes.

DE 44 13 023 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 08. 95 508 042/317

7/29

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Faktors mit insulinartiger Wirkung und seine Verwendung, insbesondere als Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes mellitus oder nicht-insulinabhängiger Diabetes.

Insulin übt eine Vielzahl von Wirkungen auf insulin-sensitives Gewebe aus. Ein auffälliger Effekt ist die schnelle Reduktion des Glucosespiegels in Säugetieren, wenn Insulin angewendet wird. Dies wird durch eine schnelle Aufnahme der Glucose aus dem Blut durch Muskel- und Fettzellen bewirkt. Insulin aktiviert ferner die Glycogen-Synthetase und inhibiert die Lipolyse. Insulin fördert die Proteinsynthese aus Aminosäuren und verstärkt die Induktion von Pyruvatdehydrogenase und Phosphofructokinase und inhibiert die Bildung von bestimmten Enzymen der Gluconeogenese wie Pyruvat-carboxylase und Fructose-1,6-bisphosphatase.

Der Diabetes Typ II, nicht-insulinabhängiger Diabetes, geht einher mit einer Insulin-Resistenz der peripheren Gewebe wie Muskel- oder Fettgewebe. Die dadurch reduzierte Glucoseverwertung wird verursacht durch fehlende Insulinstimulation des Glucosetransports und nachfolgender metabolischer Prozesse (Glycogenese, Lipogenese). Diese multiple Resistenz läßt auf einen Defekt auf Rezeptor- oder Post-Rezeptor-Ebene, d. h. vor der Erzeugung der "second messenger", schließen (Garvey, Diabetes/Metabolism Reviews, 5, (1989), 727-742).

Im Buch Psychrembel, Klinisches Wörterbuch, de Gruyter, 256. Auflage, werden wasserlösliche organische Chrom-3-Komplexe, die Nikotinsäure, Glutathion und verschiedene Aminosäuren enthalten, als Glucose-toleranzfaktor beschrieben. Dieser Faktor kann aus Bierhefe, Leber, Käse und Vollkornbrot gewonnen werden. Das Molekulargewicht des Faktors beträgt etwa 500 dalton (dt).

Die erste Isolierung eines Glucose-toleranzfaktors aus Bierhefe wird 1957 beschrieben (Schwarz und Mertz, Arch. Biochem. und Biophys. (1957) Seiten 515-518). Seitdem sind häufig Versuche unternommen worden diese gelbliche Verbindung zu reinigen, um ihre physikalisch chemischen Eigenschaften und letztlich die Struktur zu bestimmen. Es deutet sich an, daß eine Vielzahl von Faktoren mit unterschiedlicher Struktur isolierbar sind. Es ist daher möglich, daß die Struktur der jeweils isolierten Substanz von dem verwendeten Reinigungsverfahren abhängt.

Im Dokument US 5,108,610 wird eine Verbindung beschrieben, die als "Dithiochrom" bezeichnet wird. Die chemischen Eigenschaften dieser Substanz erlauben ihre Anreicherung aus eukaryotischen Zellen über eine thiolspezifische Affinitätschromatographiesäule, wobei Dithiochrom an diese Säule bindet und mit einem thiol- oder dithiolhaltigen Laufmittel eluiert werden kann. Die biologische Aktivität der Substanz wird über die erhöhte Glucoseaufnahme von humanen Adipozyten in Gegenwart von Insulin bestimmt. Obwohl Insulin selbst die Glucoseaufnahme nicht stimuliert, ist die Gegenwart von Insulin zur Entfaltung der biologischen Wirkung von Dithiochrom nötig.

Im Dokument EP 0 248 057 wird eine Verbindung beschrieben, die die Glucoseaufnahme durch Rattenadipozyten auch in Abwesenheit von Insulin steigert. Das Molekulargewicht dieser Verbindung beträgt 174 dt. Die Isolation der Verbindung gelingt aus Hefextrakten der Firma Difco (Bacto Yeast Extrakt). Die mehrere

Schritte umfassende Reinigung wurde wie folgt beschrieben. Hefextrakt wird in Wasser aufgelöst und über eine Sephadex G-75 Säule fraktioniert. Aktive Fraktionen werden gefriergetrocknet und einer Säure/5 Ethanol-Extraktion unterworfen. Nach Säurefällung wird der lösliche Überstand erneut gefriergetrocknet und nach Lösen in Ammoniumacetat auf eine Biogel-P6-Säule aufgetragen und chromatographiert. Die aktive Fraktion wird erneut gefriergetrocknet, in 50 mM 10 Ammoniumacetat gelöst und über eine Biogel P-2 Säule gereinigt. Die aktive Fraktion wird erneut gefriergetrocknet, in H₂O gelöst und über einer C-18 Reverse-Phase-HPLC-Säule analysiert und isoliert. Das isolierte Material wird während der Lagerung heterogen, was 15 auf die Instabilität der Substanz hindeutet. Der isolierte Stoff senkt in vivo den Blutzuckerspiegel.

Die Wirkung von "Okadaic acid" auf den Glucose-transport wird beim Lipogenesetest beschrieben (Lawrence et al., J. Biol. Chem. 265, Nr. 32, (1990) Seiten 19768-19776). Es zeigte sich, daß Okadaic acid die Glucoseaufnahme wie Insulin stimuliert, daß aber bei gleichzeitiger Inkubation mit Insulin eine Hemmung der Glucoseaufnahme hervorgerufen wird.

Es wurde nun ein Verfahren zur Gewinnung eines 25 Faktors mit insulinartiger Aktivität aus Hefextrakten gefunden. Dieser Faktor zeigt in vitro und an insulinresistentem Gewebe eine insulinartige Wirkung.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Faktors mit insulinartiger Wirkung, daß dadurch 30 gekennzeichnet ist, daß man

- 35 a) einen wässrigen Hefextrakt durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 2000 dt filtert,
- b) das Filtrat auf einem Anionenaustauscher aufträgt und bei einem pH von 8,5 bis 10 eluiert,
- c) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- d) die gesammelten Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule aufträgt,
- e) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- f) die gesammelten Fraktionen auf ein hydrophobes Adsorberharz aufträgt und mit Wasser eluiert,
- 45 g) die Fraktion mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- h) die gesammelten Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule aufträgt,
- i) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- k) die gesammelten Fraktionen auf eine Säule mit lipophil modifiziertem Kieselgel aufträgt und mit einem Laufmittel, enthaltend Acetonitril und Tri-fluoresigsäure, eluiert und
- 50 l) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt.

Unter dem Begriff Insulin-resistentes Gewebe werden beispielsweise Ratten-Fettzellen verstanden, bei denen Insulin keine Glucoseaufnahme mehr bewirkt. Die insulinartige Wirkung wird mit einem Lipogenesetest bestimmt (Moody et al., Horm. Metab. Res. 61(1974), Seiten 12-14).

Beim Verfahrensschritt a) geht man am besten wie folgt vor. Das Hefextraktmaterial kann käuflich erworben werden oder durch Fermentation von Hefezellen und anschließender Autolyse der Hefezellen hergestellt werden. Der Hefextrakt wird in Wasser gelöst und durch eine Membran filtriert. Als Filtrationssystem kön-

nen Platten-, Rohr-, Kapillarrohr-, Wickel- oder Hohlfasermembranmodule aus Polymeren, Kohlenstoff oder Keramik mit Trenngrenzen vom Ultrafiltrations- bis zum Sterilfiltrationsbereich eingesetzt werden. Bevorzugt werden Filtrationsmodule mit einer Porengröße von 0,2 µm bis 4 nm eingesetzt, insbesondere Filter mit einer Ausschlußgrenze von 2000 dalton (dt). Als Membranmaterialien können Polysulfone, Polyamide, Celluloseacetat, Aluminiumoxid oder Zirkonoxid eingesetzt werden. Die Filtration kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Das Filtrat kann konzentriert werden, beispielsweise durch Einengen unter verminderem Druck oder durch Gefriertrocknung.

Beim Verfahrensschritt b) wird das Filtrat auf einen pH-Wert von 8,5 bis 10 eingestellt oder die Fraktionen aus a) werden eingeengt oder gefriergetrocknet und anschließend in einem Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 gelöst, beispielsweise in Tris-HCl-Puffer 50 mM, pH 9,0. Das so eingestellte Filtrat wird dann auf einen Anionenaustauscher, der mit einem Puffer auf pH 9,0 äquilibriert ist, aufgetragen. Geeignete Anionenaustauschermaterialien sind Diethylaminoethylcellulose wie DEAE-Sephadex® oder DEAE-Cellulose Servacel®.

Der erfundungsgemäße Faktor wird im Ausschlußvolumen eluiert, und die Aktivität wird mit dem Lipogenesetest bestimmt (Verfahrensschritt c)).

Die erhaltenen Fraktionen werden direkt oder nach Konzentrierung auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, die die Trennung von Stoffen mit einem Molekulargewicht von 700 bis 1000 Dalton erlaubt (Verfahrensschritt d)). Entsprechendes Säulenmaterial ist beispielsweise Sephadex®G25, Ultrogel®AcA202 oder Trisacryl®GF05. Der Faktor mit insulinartiger Aktivität wird in einem Molekulargewichtsbereich von 700 bis 1000 dt eluiert. Die gesammelten Fraktionen können direkt oder nach Konzentrierung auf ein hydrophobes Adsorberharz aufgetragen werden (Verfahrensschritt f)).

Hydrophobe Adsorberharze sind nicht-ionische, hydrophobe, vernetzte Polymere und/oder Copolymere, beispielsweise Polyacrylate oder Polystyrol oder Copolymere aus Styrol und Divinylbenzol, insbesondere polymere Adsorberharze mit großer Oberfläche und vielen großen Poren, z. B. Handelspräparate der Firmen Rohm und Haas oder Mitsubishi Chemical Industries Ltd. wie XAD16, XAD1600 oder HP20.

Die Elution erfolgt mit Wasser und/oder mit einem Gemisch aus 30% Isopropanol und 70% Wasser. Die Aktivität des erfundungsgemäßen Faktors wird mit dem Lipogenesetest bestimmt. Die Fraktionen mit insulinartiger Aktivität werden gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Material wird in einem kleinen Volumen Wasser gelöst und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (Verfahrensschritt h)). Eine geeignete Säule ist die Biogel-P2-Säule. Der erfundungsgemäße Faktor eluiert in den ersten Fraktionen. Die Fraktionen mit insulinartiger Aktivität werden vereinigt und gefriergetrocknet und anschließend in Wasser gelöst. Die Lösung wird auf eine Säule mit lipophil modifiziertem Kieselgel aufgetragen (Verfahrensschritt k)).

Unter lipophil modifiziertem Kieselgel wird ein Kieselgel verstanden, auf das eine hydrophobe Matrix aufgebracht wurde. Beispiele für eine hydrophobe Matrix sind Alkane mit einer Kettenlänge von 3 bis 20 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugtes lipophil modifiziertes Kieselgelmateriale ist beispielsweise: Säulenmaterial des Typs Vydac 128TP1010 (The Separation Group, HESPERIA, Kalifornien, USA).

Die Elution erfolgt mit einem Laufmittel, enthaltend

0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und Acetonitril. Die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) erfolgt mit folgenden Gradienten:

Start: 98% A und 2% B, dabei ist A 0,1% TFA und B 100% Acetonitril. Nach einer Laufzeit der Chromatographie von 20 Minuten enthält das Laufmittel 40% B. Die Flußrate des Laufmittels beträgt 3 ml/min. Der Faktor mit insulinartiger Aktivität eluiert im Bereich von 5 bis 7 Minuten.

Der Faktor mit insulinartiger Wirkung dient in erster Linie als Wirkstoff für pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung des Diabetes mellitus oder nicht-insulinabhängiger Diabetes.

Die Erfindung betrifft daher auch ein Arzneimittel, das durch einen wirksamen Gehalt an dem Faktor mit insulinartiger Wirkung in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form gekennzeichnet ist.

Zwecks Variation des Wirkungsprofils der erfundungsgemäßen Arzneimittel können auch modifizierte Insuline (EP 132 769, EP 132 770, Europäische Patentanmeldung mit der Anmelde-Nr. 89 120 462.0) und/oder unmodifizierte Insuline, vorzugsweise Rinder-, Schweine- oder Humaninsulin, insbesondere Humaninsulin, zugesetzt werden.

Das Arzneimittel wird dadurch hergestellt, daß man den Faktor mit insulinartiger Wirkung, gegebenenfalls zusammen mit modifizierten und/oder unmodifizierten Insulin(derivaten), mit einem physiologisch unbedenklichen Träger sowie gegebenenfalls mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Gemisches aus dem Faktor mit insulinartiger Aktivität und Okadaic Acid zur Stimulierung der Lipogenese und/oder der Behandlung von Diabetes mellitus oder nicht-insulinabhängiger Diabetes. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Gemisches aus dem Faktor mit insulinartiger Aktivität, Okadaic Acid und Insulin zur Stimulierung der Lipogenese und/oder der Behandlung von Diabetes mellitus oder nichtinsulinabhängiger Diabetes.

Der Faktor mit insulinartiger Aktivität kann dabei in gereinigter Form oder in ungereinigter Form, z. B. nach Ultrafiltration des Hefextraktes, eingesetzt werden.

Beispiel 1

Lipogenesetest

50 Folgende wässrige Stammlösungen werden eingesetzt:

1. KRBD-Lösung

400 ml NaCl	1,8%
4 ml MgSO ₄ × 7H ₂ O	7,55%
4 ml KH ₂ PO ₄	4,22%
84 ml NaHCO ₃	2,66%
16 ml KCl	2,3%

55 Die Lösung wird 10 Minuten mit Carbogen begast.

2. KRBD Inkubationspuffer

400 ml KRBD Puffer	
5,37 mg D-(+)-Glucose	
9,6 ml CaCl ₂ × 2H ₂ O	
8,0 g Albumin	

3. KRBD Waschpuffer

200 ml KRBD Puffer
200 ml H₂O

4. Collagenaselösung (Firma Seromed) 1 mg/ml

15 mg Collagenase werden in 15 ml KRBD Waschpuffer zehn Minuten vor Gebrauch gelöst.

5. D-(+)-(3-³H)-Glucose-Lösung

1 ml D-(+)-(3-³H)-Glucoselösung der Firma Amersham (Kat. Nr. TRK 239) werden mit 1,5 ml steriles H₂O versetzt, so daß eine Stammlösung der Aktivität 400 µCi/ml entsteht. Von dieser Lösung werden Aliquots von 40 µl Volumen in Eppendorfgefäß abgefüllt und bei -20°C gelagert.

6. Insulinlösung 1 mg/ml

1 mg Humaninsulin wird in 300 µl 0,1 N HCl
500 µl KRBD-Waschpuffer gelöst und mit H₂O auf 1 ml Volumen aufgefüllt.

Das Fettgewebe über den Hoden von 5 männlichen Wistaratten (Tierzucht, Hoechst AG) wird den getöteten Tieren entnommen und in KRBD Waschpuffer gewaschen. Dann werden sorgfältig äußeres Bindegewebe und Blutgefäßreste entfernt. Je 2 der insgesamt 10 Fettgewebepröben werden in 2 ml Collagenlösung 25 Minuten bei 37°C in einem mit Carbogen gesättigten Szintillationsgefäß im kräftig schüttelnden Wasserbad inkubiert. Die Länge der Inkubation muß dabei für jede Collagenasepräparation neu festgelegt werden. Die Fettgewebepräparation wird anschließend über ein Siebnetz abgegossen und mit wenig KRBD-Waschpuffer nachgewaschen. Die Fettzellenmischung wird in ein 12 ml Reagenzglas gegossen und stehen gelassen, bis die Fettzellen sich nach oben abgesetzt haben. Die untere klare Lösung wird dann vorsichtig entfernt. Die Fettzellen werden erneut in KRBD-Waschpuffer aufgenommen und entsprechend noch dreimal gewaschen. Beim letzten Waschschritt wird die Dicke der Fettzellschicht bestimmt. Die Fettzellen werden dann in ein Becherglas überführt. Dabei werden pro 1,2 cm Zellschicht 20 ml KRBD-Waschpuffer zugesetzt. Dies entspricht erfahrungsgemäß einer Zellschicht von ca. 3,5 × 10⁵ Zellen/ml. 200 µl dieser Zellsuspension werden in ein Szintillationsgefäß überführt, in dem folgende Komponenten vorgelegt sind: 400 µl von einer Insulinlösung oder der zu testende erfundungsgemäße Faktor oder der erfundungsgemäße Faktor plus 10 ng Insulin plus 1,2 µM Okadaic Acid, 300 µl steriles Wasser; 100 µl (0,2 µCi) wäßrige D-(+)-(3-³H)-Glucoselösung. Für jedes Experiment wird zur Eichung des Systems die Stimulation der Lipogenese über eine steigende Insulinreihe mit maximal 10 ng bestimmt.

Die Inkubation erfolgt für 90 Minuten bei 37°C in einem schwach schüttelndem Wasserbad. Danach werden zu den Zellen 10 ml Quicksint 501 (Firma Zinser) gegeben, und die Szintillationsgefäß werden kräftig geschüttelt und 2 bis 4 Stunden stehen gelassen. Es bilden sich zwei Phasen, und die Radioaktivität wird aus der zellulären Phase bestimmt.

Beispiel 2

300 g "Bacto Yeast Extract" (Firma Difco Laborato-

ries, Detroit, Michigan, USA Katalog Nr. 0127-01-07) werden in 3 Liter steriles bidestilliertem Wasser aufgelöst und auf 3,5 Liter mit Wasser verdünnt und über ein Hollow Fiber Filtrationssystem (Firma Romicon, USA)

5 mit einer Membran, deren Ausschlußgrenze 2000 dt beträgt, filtriert. Dabei entstehen etwa 30 Liter Ultrafiltrat. Das Ultrafiltrat zeigt im Lipogenesetest stimulierende Wirkung, während im Retentat keine biologische Wirkung nachweisbar ist. Das Filtrat wird bei 60°C im Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von etwa 3 Litern konzentriert und anschließend lyophilisiert. Die Ausbeute an gefriergetrocknetem Material beträgt etwa 260 Gramm. Das Material wird autoklaviert um einen Abbau durch Mikroorganismen zu verhindern. Die 15 insulinartige Aktivität des Materials kann nicht an eine Thiolaffinitätsäule (Firma Biorad, Deutschland) gebunden werden. 825 mg des Materials werden in 2,5 ml 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 9) gelöst und auf eine DEAE-Sephadex®-Säule (Pharmacia, Schweden) aufgetragen. 20 Der Durchmesser der Säule beträgt 1,4 cm und die Länge 14 cm. Eine Flußrate von 2 ml/min wird eingestellt. Puffer B besteht aus 0,5 M NaCl in 50 mM Tris-HCl (pH 9). Die Detektion wird bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt. Das im Lipogenesetest aktive Material bindet nicht an die Säule und wird im Ausschlußvolumen wiedergefunden. Das Eluat wird gefriergetrocknet und anschließend in 5 ml Wasser gelöst. Das gelöste Material wird entsprechend des Molekulargewichtes über eine Sephadex®G25-Säule (Pharmacia, 25 Schweden) (Durchmesser 1,25 cm; Länge 54 cm; Flußrate 2,2 ml/min) gereinigt. Bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm wird im Molekulargewichtsbereich von 700 bis 1000 dt der Faktor mit insulinartiger Wirkung bestimmt. Nach Gefriergetrocknung wird das Material erneut in 5 ml Wasser gelöst und auf eine mit Diaion®HP20-Material (Mitsubishi Chemicals) gefüllte Säule aufgetragen (Säulendurchmesser 1,4 cm, Länge 15 cm, Flußrate 2 ml/min). Die Elution erfolgt mit 30%igen Isopropanol in Wasser. Das in Lipogenesetest 30 aktive Material wird im Ausschlußvolumen der Säule bei 254 nm Detektionswellenlänge gefunden. Der Substanz kann also ein polarer Charakter zugeordnet werden. Das Eluat wird gefriergetrocknet und in 2,5 ml Wasser gelöst und über eine weitere Filtration über 35 einer Biogel-P2-Säule (Biorad, Deutschland) (Säulendurchmesser 2,5 cm, Länge 88 cm, Flußrate 0,4 ml/min) erneut fraktioniert. Das im Lipogenesetest aktive Material eluiert in den ersten Fraktionen. Die Fraktionen werden vereinigt, gefriergetrocknet und in möglichst kleinen Volumen Wasser gelöst. Das Material wird auf eine C18 reversed Phase Säule des Typs Vydac 218TP1010 (The Separation Group, Hesperia, Kalifornien, USA) aufgetragen und einer Hochdruckflüssigchromatographie unterzogen. Unter den vorgegebenen Bedingungen (Start A: 98% von 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) bezogen auf Wasser; B: 100% Acetonitril; Flußrate 3 ml/min; Nach einer Laufzeit von 20 Minuten wird ein Gradient mit 40% B und 60% A erreicht) eluiert das im Lipogenesetest aktive Material im Bereich zwischen 5,77 bis 6,07 Minuten in charakteristischer Weise. Die aktive Fraktion wird durch Rechromatographie auf einer entsprechenden Säule unter Einsatz eines flacheren TFA/Acetonitril-Gradienten rechromatographiert. Es entstehen im Chromatogramm 3 Peaks von denen nur in einer Fraktion im Lipogenesetest aktives Material isoliert werden kann.

Beispiel 3

Bestimmung der insulinartigen Wirkung in Gegenwart von "Okadaic Acid"

Die biologische Aktivität wird entsprechend Beispiel 1 bestimmt. Die Lipogenesestimulation durch 10 ng Insulin wird als 100% Wert angesetzt. Eine Lösung mit 1,7 μ M Okadaic Acid (Sigma Chemie GmbH, Deutschland) ergibt eine Stimulation von ca. 55%. Ein Gemisch aus 10 ng Insulin und 1,7 μ M Okadaic Acid ergibt eine Stimulation von ca. 80%. 250 μ g des Hefeextraktes nach Ultrafiltration (Beispiel 2) ergeben etwa 70% Stimulation. Ein Gemisch aus Okadaic Acid (1,7 μ M) und ultrafiltriertem Hefeextrakt (250 μ g) ergibt eine 200%ige Stimulation und ein Gemisch aus den Komponenten Insulin (10 ng), ultrafiltriertem Hefeextrakt (250 μ g) und Okadaic Acid ergibt eine 200 bis 300%ige Stimulation.

lung von Diabetes mellitus oder nichtinsulinabhängiger Diabetes.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich Insulin, vorzugsweise Human-, Schweine- oder Rinderinsulin, oder Insulinderivate einsetzt.

7. Verwendung von einem wäßrigen Hefeextrakt nach Filtration durch einen Membran mit einer Ausschlußgrenze von 2000 dalton und Okadaic Acid zur Herstellung eines Arzneimittels mit Lipogenese stimulierender Wirkung.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich Insulin, vorzugsweise Human-, Schweine- oder Rinderinsulin, oder Insulinderivate einsetzt.

9. Faktor mit insulinartiger Wirkung erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung eines Faktors mit insulinartiger Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen wäßrigen Hefeextrakt durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 2000 dalton filtriert,
- b) das Filtrat auf einem Anionenaustauscher aufträgt und bei einem pH von 8,5 bis 10 eluiert,
- c) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- d) die gesammelten Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule aufträgt,
- e) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- f) die gesammelten Fraktionen auf ein hydrophobes Adsorberharz aufträgt und mit Wasser eluiert,
- g) die Fraktion mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- h) die gesammelten Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule aufträgt,
- i) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt,
- k) die gesammelten Fraktionen auf eine Säule mit lipophil modifiziertem Kieselgel aufträgt und mit einem Laufmittel enthaltend Acetonitril und Trifluoressigsäure eluiert und
- l) die Fraktionen mit insulinartiger Wirkung sammelt.

2. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt von dem Faktor mit insulinartiger Wirkung erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1.

3. Verwendung von dem Faktor mit insulinartiger Wirkung erhalten nach Anspruch 1 und Okadaic Acid zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes mellitus oder nicht-insulin-abhängiger Diabetes.

4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich Insulin, vorzugsweise Human-, Schweine- oder Rinderinsulin, oder Insulinderivate einsetzt.

5. Verwendung von einem wäßrigen Hefeextrakt nach Filtration durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 2000 dalton und Okadaic Acid zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes mellitus oder nichtinsulinabhängiger Diabetes.

- Leerseite -

Factor with insulin-like activity from yeast extract

Publication number: DE4413023
Publication date: 1995-10-19
Inventor: HABERMANN PAUL DR (DE); FADDA MAURO (DE)
Applicant: HOECHST AG (DE)
Classification:
- **international:** A61K38/28; A61K38/28; (IPC1-7): A61K35/72
- **European:** A61K36/06; A61K38/28
Application number: DE19944413023 19940418
Priority number(s): DE19944413023 19940418

[Report a data error here](#)

Abstract of DE4413023

Prepn. of a factor (I) with insulin-like activity comprises: (a) filtering an aq. yeast extract through a membrane with an exclusion limit of 2000Da; (b) applying the filtrate to an anion exchanger and eluting at pH 8.5-10; (c) collecting active fractions and applying them to a gel filtration column; (d) collecting active fractions, applying them to a hydrophobic adsorber resin and eluting with water; (e) collecting active fractions and applying to a gel filtration column; (f) collecting active fractions, applying them to a column of lipophilic modified silica gel and eluting with a mobile phase contg. MeCN and Cf3COOH; and (g) collecting active fractions. Also claimed is the prod. of above process.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide